



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication : **0 450 991 A2**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt : **91400304.1**

(51) Int. Cl.⁵ : **A61K 31/66, A61K 31/685**

(22) Date de dépôt : **08.02.91**

(30) Priorité : **20.02.90 FR 9001999**

(43) Date de publication de la demande :
09.10.91 Bulletin 91/41

(84) Etats contractants désignés :
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur : **SYNTHELABO**
58 rue de la Glacière
F-75013 Paris (FR)
Demandeur : **INSTITUT NATIONAL DE LA**
SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
(INSERM)
101, rue de Tolbiac
F-75654 Paris Cédex 13 (FR)

(72) Inventeur : **Girod-Vaquez, Sophie, INSERM U**
314
CHR Maison Blanche, 45, rue Cognacq Jay
F-51092 Reims Cédex (FR)
Inventeur : **Puchelle, Edith, INSERM U 314**
CHR Maison Blanche, 45, rue Cognacq Jay
F-51092 Reims Cédex (FR)
Inventeur : **Galabert, Claude**
Hôpital Renée Sabran
Glens, F-83406 Hyeres (FR)
Inventeur : **Zahm, Jean-Marie, INSERM U 314**
CHR Maison Blanche, 45, rue Cognacq Jay
F-51092 Reims Cédex (FR)
Inventeur : **Pierrot, Denis, INSERM U 314**
CHR Maison Blanche, 45, rue Cognacq Jay
F-51092 Reims Cédex (FR)

(74) Mandataire : **Thouret-Lemaître, Elisabeth et al**
SYNTHELABO Service Brevets 22, avenue
Galilée
F-92352 LE PLESSIS ROBINSON CEDEX (FR)

(54) **Utilisation de phospholipides dans le traitement des maladies obstructives des voies aériennes.**

(57) **Composition pharmaceutique à base de phospholipides utile pour le traitement de l'obstruction des voies aériennes, composition caractérisée en ce qu'elle contient, seul ou en association, un ou plusieurs phospholipides, tels que les phosphatidylcholines, les phosphatidylglycérols, ou les acides phosphatidiques.**

EP 0 450 991 A2

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES A BASE DE PHOSPHOLIPIDES

La présente invention a pour objet des compositions pharmaceutiques à base de phospholipides.

L'intégrité de l'épithélium de la muqueuse respiratoire dépend d'un équilibre entre les facteurs d'agression et les mécanismes de défense dont elle dispose. La première ligne de défense de l'arbre trachéo-bronchique est représentée par le mucus qui forme à la surface des cellules épithéliales respiratoires un film protecteur mobilisé en permanence par l'activité ciliaire.

Au cours des phénomènes inflammatoires bronchiques, aigus ou chroniques, l'hypersécrétion de mucus s'accompagne d'une modification de ses propriétés rhéologiques avec un accroissement de la viscosité et de l'adhérence. Ces anomalies se traduisent par une diminution de l'épuration muco-ciliaire et une stase du mucus avec obstruction bronchique. Le transport du mucus par la toux peut alors suppléer la déficience de la clairance muco-ciliaire. Il est donc très important de préserver l'efficacité de cette toux qui dépend non seulement des propriétés de viscosité et de visco-élasticité du mucus, mais qui peut être également largement influencée par les propriétés interfaciales entre le mucus et la muqueuse respiratoire.

Jusqu'à présent, les thérapeutiques visant à corriger l'hypersécrétion du mucus et ses anomalies se sont toutes développées en partant du concept de base que le traitement de l'hypersécrétion devait avant tout porter sur la modification de la viscosité du mucus considérée comme seul facteur physique à l'origine de la stase du mucus et de l'obstruction bronchique. Ce concept a donné naissance à la mise au point de nombreuses molécules à activité mucolytique agissant *in vitro* ou *in vivo* et ayant pour but de normaliser l'hyperviscosité du mucus.

En fait, au cours des infections bronchiques aiguës et/ou chroniques, les sécrétions adhèrent fortement à la muqueuse et leur élimination par l'activité ciliaire, et plus encore par la toux, ne peut être que difficilement améliorée par la simple prescription d'une thérapeutique mucolytique. En effet, ces mucolytiques, qu'ils soient actifs *in vivo* ou *in vitro*, n'interviennent que sur la structure fibrillaire de la phase gel du mucus et n'ont aucune activité au niveau des propriétés tensio-actives du mucus.

Le mucus possède des constituants naturels biochimiques parmi lesquels figurent les phospholipides qui sont susceptibles de modifier les propriétés interfaciales mucus-muqueuse.

Il a été démontré dans de nombreuses études, en particulier dans le syndrome de détresse respiratoire aigu du nouveau-né, qu'un poumon immature pauvre en surfactant, c'est-à-dire en matériel tensio-actif, pouvait être rendu fonctionnel par la simple injection de surfactant artificiel ou naturel. Un grand nombre d'études ont également montré la présence de phospholipides, en particulier de phosphatidylcholine, dans le mucus respiratoire et les expectorations, aussi bien chez les sujets sains que chez les sujets atteints de maladies respiratoires avec hypersécrétion.

Les phospholipides, incluant les phospholipides à propriétés tensio-actives, se sont vus attribuer un rôle de stabilisant des petites voies aériennes. On leur a également attribué, en tant qu'agents tensio-actifs présents à l'interface phase sol-phase gel du mucus et grâce à leur propriétés hydrophobes, un rôle de régulation du contenu en eau de la phase sol. Par contre, malgré les hypothèses émises, aucun travail n'a montré jusqu'à maintenant, comment par leur présence à l'interface phase sol-phase gel du mucus, ces phospholipides pouvaient effectivement jouer un rôle protecteur de la muqueuse respiratoire et un rôle lubrifiant dans le transport de la phase gel sur la phase sol par le tapis ciliaire ou par le mécanisme de la toux.

En pathologie bronchique comme la mucoviscidose, des travaux antérieurs ont permis de montrer que dans les expectorations, certaines fractions lipidiques étaient augmentées et significativement corrélées à la viscosité (cholestérol, glycosphingolipides, sphingomyéline) et pourraient donc être considérées comme des facteurs "rigidifiants". A l'opposé, il a été montré que certaines fractions phospholipidiques, comme le phosphatidylglycérol, étaient au contraire négativement corrélées à la viscosité. Il apparaissait que le phosphatidylglycérol, bien que retrouvé en faible quantité dans les sécrétions bronchiques (10 % des phospholipides totaux), était susceptible de faciliter le transport du mucus par le mouvement des cils de la muqueuse respiratoire ou par le phénomène de la toux en modifiant les propriétés visco-élastiques du mucus (référence : Galabert et al, Clin. Chim. Acta, 1987, 164 : 139-149).

Les Demanderesses ont étudié le rôle des différentes fractions phospholipidiques, connues au niveau alvéolaire pour abaisser la tension de surface, dans les modifications des propriétés tensio-actives du mucus au niveau des voies aériennes. Les travaux ont débuté par une étude chez des patients atteints de mucoviscidose et de bronchopathies chroniques obstructives, chez lesquels ont été mesurés en parallèle le contenu en fractions phospholipidiques des expectorations et les propriétés de surface des fractions phospholipidiques. Le lien entre les données biochimiques et les propriétés physiques des expectorations étudiées a été analysé.

Le recueil des expectorations est fait en évitant toute contamination salivaire. Les patients sont répartis en deux groupes composés de dix-huit mucoviscidosiques et de seize hypersécrétants bronchitiques chroni-

ques avec obstruction. Les lipides ont été séparés et identifiés par des techniques classiques ; pour cela, les expectorations sont immédiatement congelées, puis lyophilisées : l'extraction des lipides se fait à partir du matériel lyophilisé.

L'extraction quantitative des lipides est effectuée suivant la méthode de Bligh E.G. and Dyer W.J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, 911-917 : 100 mg de matériel lyophilisé sont réhydratés dans 1 ml d'eau distillée. Les lipides sont alors extraits par un mélange chloroforme/méthanol (1v/2v), puis dans un deuxième mélange chloroforme/méthanol (1v/1v). Après addition d'eau, la phase chloroformique est séparée. Trois extractions complémentaires par addition de 2,5 ml de chloroforme sont ensuite effectuées. Les différentes phases chloroformiques sont alors réunies, évaporées à sec sous

azote et P_2O_5 , puis pesées avant d'être remises en solution dans du chloroforme. Les phospholipides totaux et les fractions phospholipidiques séparées par chromatographie en couche mince bidimensionnelle ont été dosés par la méthode de Rouser et al (Lipids, 1970, 5, 494-496) dont le principe est le microdosage du phosphore après minéralisation des phospholipides par l'acide perchlorique et séparation par chromatographie en couche mince bidimensionnelle.

A partir du dosage des phospholipides dans ces sécrétions, il a été montré que les phospholipides totaux étaient significativement plus élevés dans la mucoviscidose que dans les bronchopathies chroniques obstructives (respectivement 4,40 % contre 2,96 % de poids sec du mucus ($p < 0.01$)). Le pourcentage relatif de phosphatidylcholine et de phosphatidylglycérol est significativement plus faible ($p < 0.001$) dans la mucoviscidose que dans les bronchopathies chroniques obstructives (Tableau I). Les pourcentages relatifs de sphingomyéline et de phosphatidylsérine + phosphatidylinositol sont significativement plus élevés ($p < 0.001$) dans la mucoviscidose que dans les bronchopathies chroniques obstructives (Tableau I).

TABLEAU I
pourcentage des principales fractions phospholipidiques
par rapport aux phospholipides totaux

	PG	PC	SM	PS+PI
Mucoviscidose	4,41	36,32	22,24	15,10
Bronchopathies	7,48	46,47	12,44	11,76

PC : phosphatidylcholine ; PG : phosphatidylglycérol ;
SM : sphingomyéline ; PS+PI : phosphatidylsérine + phosphatidylinositol.

Dans le cas de la mucoviscidose, où les sécrétions sont très adhérentes et très visqueuses, on trouve moins de fractions tensio-actives (phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol) et plus de fractions "rigidifiantes" (sphingomyéline) dans les expectorations que dans les autres bronchopathies.

Une étude physique de ces sécrétions a été effectuée en parallèle. La propriété physique choisie est la mouillabilité des sécrétions qui renseigne sur la capacité d'une sécrétion à mouiller une surface. La mouillabilité est évaluée par un paramètre physique appelé angle de contact. L'angle de contact peut être défini comme l'angle existant entre la tangente à une goutte de liquide déposée sur un support solide (à l'interface liquide-air) et la surface du solide (à l'interface solide-liquide) au point triple T_p .

L'angle de contact est dépendant du solide, de la nature du liquide et de l'interaction entre eux. Dans cette étude, nous avons étudié le comportement des sécrétions bronchiques lorsqu'elles sont mises en contact avec un support qui simule la muqueuse bronchique. L'angle de contact est un index de mouillabilité qui renseigne sur les propriétés tensio-actives du liquide pour un solide donné : plus l'angle de contact est grand, moins le liquide s'étale et moins il est mouillant.

Une technique de mesure automatique de l'angle de contact basée sur le traitement d'image associé à un traitement informatique a été développée. Dans les mesures de mouillabilité des sécrétions, il a été choisi de mesurer l'angle de contact d'une goutte calibrée (5 μ l) de sécrétion mise en contact avec un support de verre parfaitement propre, chargé électronégativement et placé dans une enceinte saturée en vapeur d'eau pour éviter les phénomènes de deshydratation. (référence : S. Girod et al. T.B.M., 1988, 9 402-412).

Le phosphatidylglycérol apparaît comme un phospholipide important contrôlant la mouillabilité des sécrétions bronchiques et susceptibles d'influencer leur transport et leur comportement lorsqu'elles sont en contact avec la muqueuse. Les Demanderesses ont donc étudié l'influence de différents phospholipides sur les propriétés de mouillabilité du mucus respiratoire et sur sa capacité à être mobilisé et transporté par le mécanisme de la toux. Une expérimentation visant à étudier l'effet in vitro de différentes fractions phospholipidiques sur la mouillabilité et le transport par la toux de mucus considérés comme "normaux" a donc été mise en oeuvre.

Les mucus sont prélevés sur la muqueuse du palais de grenouille considérée comme un bon modèle représentatif de la muqueuse respiratoire humaine. La mouillabilité de ces mucus est mesurée comme il a été décrit précédemment. La clairance par la toux de ces mucus a été mesurée à l'aide d'une machine à tousser. Le principe de cette machine est le suivant : le support sur lequel la goutte de mucus est déposée est placé comme plancher d'un tube en plexiglas qui simule la trachée. Ce tube en plexiglas d'une section rectangulaire (20 mm x 10 mm) est connecté à une enceinte fermée par une électrovanne. La pression dans l'enceinte est amenée à 0,6 bar, puis l'électrovanne est ouverte et le débit d'air que subit la goutte est de 6 l/s. On mesure le déplacement de la goutte sur le support sous l'influence du courant d'air ainsi provoqué qui simule le mécanisme de la toux.

Les supports utilisés sont soit des lames de verre simples, soit des lames de verre recouvertes d'une monocouche de phospholipides grâce à une balance à film de Langmuir : 10 mg de chaque fraction phospholipidique sont dissous dans un mélange chloroforme/méthanol (9:1) et 16 µl de cette solution sont déposés dans la cuve de la balance à film remplie d'eau tridistillée. Une barrière de téflon comprime le film phospholipidique jusqu'à la pression de collapse propre à chaque phospholipide, où toutes les molécules de phospholipide sont en contact sans trou dans la monocouche. Le support de verre préalablement immergé dans la cuve est ensuite retiré à une vitesse constante et, parallèlement, la barrière de téflon avance de façon à maintenir également constante la tension de surface du film ainsi prélevé ; le support de verre ainsi obtenu présente en surface une monocouche orientée de phospholipides accrochés par leur tête polaire au verre et exposant à l'air leurs groupements apolaires (en contact avec le mucus).

Les phospholipides choisis pour cette étude sont le phosphatidylglycérol (diC_{18:1}) (Sigma 9399) et le phosphatidylglycérol (diC_{18:0}) (Sigma 9524) : les deux fractions ont donc la même tête polaire, la même longueur de chaînes apolaires mais des degrés de saturation différents. On garde comme témoins des lames de verre non recouvertes de phospholipides.

Il ressort que le phosphatidylglycérol (diC_{18:0}) améliore significativement la clairance par la toux du mucus de grenouille et diminue significativement sa mouillabilité, en comparaison avec les lames de verre non recouvertes ($p < 0,001$ et $p < 0,01$) ou même avec les lames de verre recouvertes de phosphatidylglycérol (diC_{18:1}) ($p < 0,001$ et $p < 0,01$). Le phosphatidylglycérol (diC_{18:0}) semble être la fraction phospholipidique qui en diminuant les propriétés d'adhésion du mucus en améliore sa clairance par la toux (la fraction la plus lubrifiante).

La phosphatidylcholine sous forme de dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (diC_{18:0}) a également été étudiée sur la mouillabilité et la capacité de transport par la toux.

Compte tenu de ces études, les Demanderesses revendiquent des compositions pharmaceutiques contenant, un ou plusieurs phospholipides, seul(s) ou en association avec des excipients appropriés.

Le ou les phospholipide(s) peuvent être choisis parmi les phosphatidylcholines, les phosphatidylglycérols et les acides phosphatidiques.

Les phospholipides cités ci-dessus contiennent de préférence, comme radicaux acyles, les radicaux saturés palmitoyle C_{16:0} et stéaroyle C_{18:0} et/ou les radicaux insaturés oléoyles C_{18:1} et C_{18:2}.

Les radicaux acyles des phospholipides peuvent éventuellement contenir plusieurs doubles liaisons.

Les phospholipides utilisés selon l'invention peuvent contenir des radicaux acyles identiques ou différents, saturés ou non.

Les phospholipides utilisés dans les compositions de l'invention contiennent tout particulièrement deux radicaux acyles saturés identiques.

Les phospholipides peuvent être utilisés seuls ou, de préférence, en mélange entre eux dans des proportions variables.

Les compositions de l'invention peuvent être présentées sous la forme de suspensions micellaires ou sous la forme de suspensions de liposomes. Elles peuvent être administrées par voie orale ou par voie aérienne, par exemple par inhalation (sous la forme d'aérosols) ou par instillation.

Les compositions de l'invention sont préparées à l'aide des excipients appropriés à leurs formes d'administration.

Les compositions de l'invention peuvent également contenir des agents thérapeutiques connus par leur activité dans le domaine des maladies bronchopulmonaires et susceptibles d'avoir une activité propre sur la muqueuse bronchique.

En particulier, il est possible d'associer aux phospholipides, sous forme de suspensions micellaires (ou

d'émulsions) ou sous forme de suspensions de liposomes, en instillations ou en aérosols, les composés suivants :

- des agents protecteurs contre les radicaux libres tels que les dérivés de la cystéine ou la superoxyde dismutase,
 - 5 - des substances antibactériennes telles que le lysozyme ou l'asialo-GM1-ganglioside
 - des facteurs de croissance tels que insuline, dérivés de l'acide rétinoïque, epithelium growth factor (ou EGF) et platelet-derived-growth factor (ou PDGF),
 - des facteurs de réparation tels que la glycyl-L-histidyl-L-lysine et d'autres peptides purifiés à partir de cellules épithéliales ou mésenchymateuses,
 - 10 - des agents d'hydratation du mucus tels que l'ATP.
- Les compositions de l'invention sont utilisées pour le traitement des maladies bronchopulmonaires.

Revendications

- 15 1. Composition pharmaceutique à base de phospholipides utile pour le traitement de l'obstruction des voies aériennes, composition caractérisée en ce qu'elle contient, seul ou en association, un ou plusieurs phospholipides, tels que les phosphatidylcholines, les phosphatidylglycérols, ou les acides phosphatidiques.
- 20 2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle contient la dipalmitoylphosphatidylcholine.
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle contient la distearoyl-phosphatidylcholine
- 25 4. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle contient le phosphatidylglycérol diC_{18:0}.
5. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle contient le phosphatidylglycérol diC_{18:1}.
- 30 6. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée par le fait qu'elle contient le phosphatidylglycérol diC_{18:0}.
- 35 7. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée par le fait qu'elle est présentée sous la forme de suspension micellaire.
8. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée par le fait qu'elle est présentée sous la forme de suspension de liposomes.
- 40 9. Composition pharmaceutique pour le traitement de l'obstruction des voies aériennes, composition caractérisée en ce qu'elle contient un ou plusieurs phospholipides, tels que les phosphatidylcholines, les phosphatidylglycérols, ou les acides phosphatidiques en association avec un agent thérapeutique ayant une activité propre sur la muqueuse bronchique.
- 45 10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique ayant une activité propre sur la muqueuse bronchique est choisi parmi les composés suivants :
 - des agents protecteurs contre les radicaux libres tels que les dérivés de la cystéine ou la superoxyde dismutase,
 - 50 - des substances antibactériennes telles que le lysozyme ou l'asialo-GM1-ganglioside
 - des facteurs de croissance tels que insuline, dérivés de l'acide rétinoïque, epithelium growth factor (ou EGF) et platelet-derived-growth factor (ou PDGF),
 - des facteurs de réparation tels que la glycyl-L-histidyl-L-lysine et d'autres peptides purifiés à partir de cellules épithéliales ou mésenchymateuses,
 - 55 - des agents d'hydratation du mucus tels que l'ATP.

Revendications pour les états contractants suivants : ES et GR.

1. Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique à base de phospholipides utile pour le traitement de l'obstruction des voies aériennes et contenant seul ou en association, un ou plusieurs phospholipides, tels que les phosphatidylcholines, les phosphatidylglycérols, ou les acides phosphatidiques, procédé caractérisé en ce que l'on prépare la composition à partir des constituants actifs cités ci-dessus et des excipients adéquats pour la présenter sous la forme de suspension micellaire ou de suspension de liposomes.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition contient la dipalmitoylphosphatidylcholine.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition contient la distearoyl-phosphatidylcholine
4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition contient le phosphatidylglycérol diC_{18:0}.
5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition contient le phosphatidylglycérol diC_{18:1}.
6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la composition contient le phosphatidylglycérol diC_{18:0}.
7. Procédé de préparation selon la revendication 1, caractérisé en ce que la composition contient un ou plusieurs phospholipides, tels que les phosphatidylcholines, les phosphatidylglycérols, ou les acides phosphatidiques en association avec un agent thérapeutique ayant une activité propre sur la muqueuse bronchique.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé par le fait que l'agent thérapeutique ayant une activité propre sur la muqueuse bronchique est choisi parmi les composés suivants :
 - des agents protecteurs contre les radicaux libres tels que les dérivés de la cystéine ou la superoxyde dismutase,
 - des substances antibactériennes telles que le lysozyme ou l'asialo-GM1-ganglioside
 - des facteurs de croissance tels que insuline, dérivés de l'acide rétinolique, epithelium growth factor (ou EGF) et platelet-derived-growth factor (ou PDGF),
 - des facteurs de réparation tels que la glycyl-L-histidyl-L-lysine et d'autres peptides purifiés à partir de cellules épithéliales ou mésenchymateuses,
 - des agents d'hydratation du mucus tels que l'ATP.